动 物 学 研 究 1994, 15 (增刊): 119—123 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research

鲤鱼卵黄中蛋白质水解酶的研究*

赵小凡 王金星 李 明

(山东大学生物系 济南 250100)

摘要 本文对鲤鱼卵黄中蛋白水解酶进行了研究，证明鲤鱼卵母细胞中存在蛋白水解酶，蛋白酶在 pH3 左右对卵黄蛋白产生水解作用，酶活性能被 E-64 和 pepstatin 抑制，说明蛋白酶分属于半胱氨酸蛋白酶类(又称巯基蛋白酶类)和天冬氨酸蛋白酶类(又称酸性蛋白酶类)。在 pH4 时，蛋白酶对牛血红蛋白具有较高的水解率。此外，对鲤鱼的卵黄蛋白进行了 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。

关键词 鲤鱼，卵黄蛋白水解酶，性质

卵生动物胚胎发育的氨基酸来源于卵黄蛋白的水解，而卵黄蛋白的水解是由一系列酶共同作用并且高度调控而实现的。对卵黄中的蛋白水解酶进行研究，鉴定酶的类别，确定酶的性质，进而阐明酶的活化及调控机制，对于了解胚胎发育早期卵黄蛋白的分解代谢机理具有重要意义。

在昆虫中对卵黄蛋白的分解代谢已有一些报道，目前已纯化出多种蛋白水解酶，如半胱氨酸蛋白酶(Kageyama 等，1990；赵小凡等，1993，1994)、丝氨酸蛋白酶(Ikeda 等，1990)等。对酶的作用机制也已有了初步了解。在胚胎发育过程中，由于卵黄颗粒膜上的质子——ATP 酶的作用使其发生酸化，导致以前体形式存在的蛋白酶原被激活成蛋白酶(Fagotoo，1991)。酶作用的 pH 通常在酸性范围。

由于卵黄蛋白分解代谢机理研究是近十几年兴起的，除了在昆虫特别是家蚕中研究较多外，其它卵生动物少有报道。鱼类卵黄蛋白的降解机理是否与昆虫相同?从理论上讲，鱼类胚胎发育早期氨基酸来源于卵黄蛋白的水解，孵化率的高低与卵黄蛋白水解酶的作用有重要联系，酶一方面受内部各种因素的调控，另一方面外界环境也有一定的影响。

研究鱼类卵黄蛋白水解酶，鉴定酶的类别及性质，对鱼类繁育具重要意义，同时也为探讨卵生动物胚胎发育早期蛋白质分解代谢规律提供参考资料。鲤鱼材料易得，在对酶进行定性研究的基础上，可进一步纯化蛋白酶，进行更深入的研究。

1 材料及方法

1.1 材料

1.1.1 动物 从性成熟的雌性鲤鱼泄殖孔轻轻挤出卵粒，洗净备用。

---

* 山东大学青年科学基金资助项目

本文 1994 年 8 月 31 日收到，同年 11 月 13 日修回

1.1.2 化学试剂 标准蛋白质(分子量 43—200 kDa)和牛血红蛋白由上海生物化学研究所生产。抑制剂为 Sigma 公司产品。聚丙烯酰胺凝胶电泳试剂为分析纯产品。福林-酚试剂由本实验室制备。

1.2 方法

1.2.1 卵母细胞提取液 取 5 g 卵，加入 pH7.5 的 0.01 mol／L Tris-HC1 缓冲液 5 ml，冰浴中匀浆，离心 10 min，12000 r／min。取上清液备用。按 Lowry 法测得蛋白质含量为 0.67 mg／ml，以牛血清蛋白制作标准曲线。

1.2.2 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)按 Laemmli 方法进行。胶浓度为 10%，电流 40 mA，电压 100 V，电泳时间 7—9 h。考马氏亮兰染色。

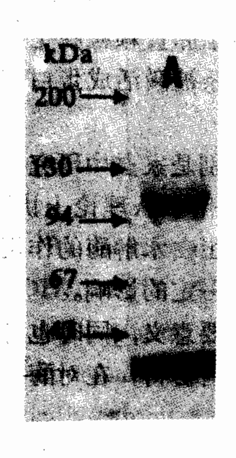
1.2.3 蛋白酶分析 取卵母细胞提取液 20 μl，加入到 200 μl 0.2 mol／L 不同 pH 条件的缓冲液中，于 37℃温育 1 h。经电泳前样品处理，进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。

1.2.4 蛋白酶对牛血红蛋白的作用 以不同 pH 的缓冲液配制 2%牛血红蛋白作底物，加入 20 μl 卵母细胞提取液，在 37℃温育 1 h，取 5% TCA (三氯醋酸)中止反应，用滤纸过滤去除沉淀后，在日立 UV-240 机上测 280 nm 吸光值，并绘制曲线。对照组按同样方法在不同 pH 条件下温育，但不加卵母细胞提取液。

1.2.5 抑制实验 取 20 μl 卵母细胞提取液与不同的抑制剂混合，再加入到 200 μl 0.01 mol／L，pH3 的 Tris-HCl 缓冲液中温育 2.5 h，再进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。

2 结果

鲤鱼卵黄蛋白提取液经 SDS-PAGE 分析，表现出一条主要的蛋白质区带，其分子量



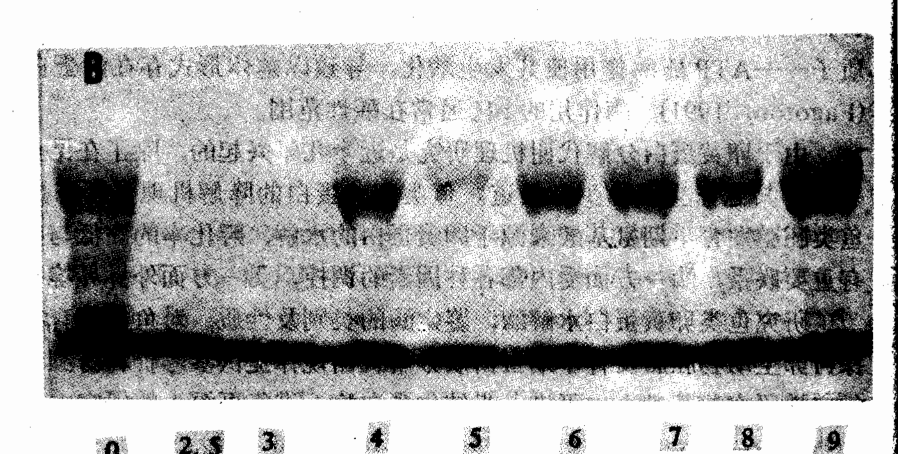


图 1 SDS-PAGE

A. 鲤鱼卵黄蛋白组分；B. pH 对蛋白酶活性的影响；O. 对照(pH7，不温育)，加样量 100 μg

A. The composition of the yolk proteins in *Cyprinus carpio*; B. The effect of the pH on the activity of the proteinases. Lane O is control. 100 μg proteins／lane. pH3

经 SDS-PAGE 测定在 110 kDa 左右，表明鲤鱼的卵黄中有一类分子量较大的蛋白质，其含量最为丰富，其余蛋白质组分含量较少(图 1A)。

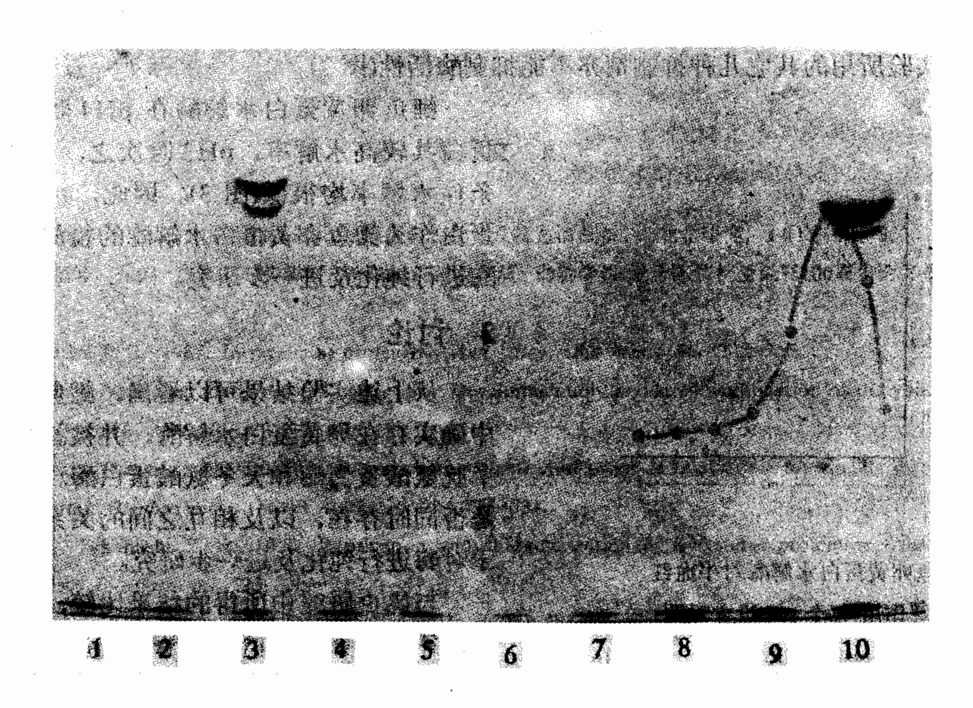


图 2　SDS-PAGE，显示抑制剂对内源性蛋白酶的影响(pH3，加样量 100 μg)

Fig. 2　SDS-PAGE. To show the effects of inhibitors on the endogenous proteinases. pH 3. 100 μg proteins / lane

1. 对照，不加抑制剂，2-10 加入不同抑制剂，名称及用量，见表 1

Lane 1. control; lane 2-10. with various inhibitors listed in table 1

表 1　抑制剂名称及浓度

Tab. 1　Inhibitors and concentration

抑制剂名称	浓度(mmol)
1. reference	
2. $TospheCH_2$ Cl	0.1
3. Pepstatin	0.1
4. N-Ethylmaleimide	0.1
5. Chymostatin	0.05
6. EDTA	1
7. 2-mercaptoethanol	1
8. iPr_2 P-F	0.1
9. $PhMeSO_2$ F	0.1
10. E-64	0.05

卵母细胞匀浆液在不同 pH 条件下温育后，再进行 SDS-PAGE，结果显示在 pH2.5 和 pH3 条件下温育的样品，卵黄蛋白几乎被完全水解，而在 pH4-9 条件下温育的卵黄蛋白不发生水解。这一结果表明卵母细胞提取液中存在有蛋白酶，其作用酸碱度在 pH 3 左右(图 1B)。

为了进一步证明在 pH3 条件下卵黄蛋白的水解是由于内源性蛋白酶作用的结果，并鉴定蛋白酶的属性，我们采用多种蛋白酶抑制剂进行了抑制实验。抑制剂种类及浓度见表 1。

实验结果显示，在加入 Pepstatin 和 E-64 时，卵黄蛋白不能被水解，说明酶活性受到了抑制，pH3 条件下卵黄蛋白的水解是由一定的酶作用的结果。

Pepstatin 是天冬氨酸蛋白酶类的特异性抑制剂，而 E-64 是半胱氨酸蛋白酶类的特异性抑制剂，由此推测卵母细胞内含有天冬氨酸蛋白酶和半胱氨酸蛋白酶。而金属蛋白酶类抑制剂 EDTA 和丝氨酸蛋白酶类抑制剂 iPr_2P-F 和 $PhMeSO_2F$ 不能抑制蛋白酶活性。此外，实验所用的其它几种抑制剂亦不能抑制酶活性(图 2)。

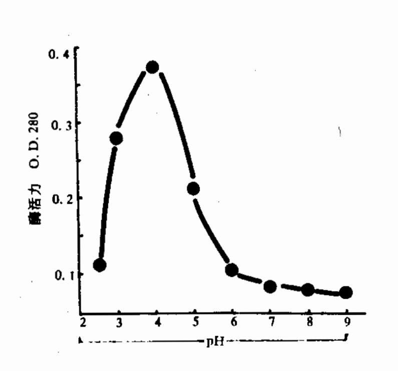


图 3 鲤鱼卵黄蛋白水解酶对牛血红蛋白的水解作用(每个 pH 设立对照)

Fig. 3 Hydrolysis of bovine hemoglobin by the proteinases in the egg yolk of *Cyprinus carpio* at various pH

鲤鱼卵黄蛋白水解酶在 pH4 时对牛血红蛋白具较高水解率，pH3 时次之，在其它 pH 条件水解率均很低(图 3)。因此，可用牛血红蛋白作为鲤鱼卵黄蛋白水解酶的检测底物，对酶进行纯化及进一步研究。

3 讨论

从上述实验结果可以看出，鲤鱼卵母细胞中确实存在卵黄蛋白水解酶，并被初步鉴定为半胱氨酸蛋白酶和天冬氨酸蛋白酶。这两类酶是否同时存在，以及相互之间的关系，还有待于对酶进行纯化及进一步研究。

与昆虫研究中所得的结果比较，有一些共同规律。如卵黄蛋白水解酶的作用 pH 都在酸性范围，均含有能被 E-64 和 pepstatin 抑制的蛋白酶类。天冬氨酸蛋白酶过去被称为酸性蛋白酶，而半胱氨酸蛋白酶由于含有巯基，过去被称为巯基蛋白酶(thiol proteinase)。一般认为天冬氨酶酸蛋白酶类催化的是酸碱反应，而不是共价的酶-底物中间化合物的形成。而多数半胱氨酸蛋白酶类具有普遍的蛋白酶活性，可能参与蛋白质水解的开始和结束(Bond 等，1987)。推测鱼类胚胎发育早期卵黄颗粒也会发生酸化。

鉴于鲤鱼卵黄蛋白水解酶必需在酸性条件下温育一定时间才能水解卵黄蛋白，说明该蛋白酶是以酶原形式存在于卵母细胞中，经酸化后被激活，这一特性与昆虫中的卵黄蛋白水解酶相同。不同之处在于：鲤鱼卵黄蛋白水解酶一旦被激活，其水解作用非常迅速，很难检测到被水解后的较大的肽段。这可能是由于鱼类胚胎发育期短，因而酶的作用效率很高。

在抑制实验中，E-64* 和 pepstatin 对酶有较强的抑制作用，而其它巯基阻断剂如 $TospheCH_2Cl$、N-Ethylmaleimide 和 Chymostatin 等不能阻抑卵黄蛋白的水解，可能由于酶对这些抑制剂不敏感。同时，温育时间长短对结果也有一定的影响，致使一些轻微的抑制作用不能表现出来。

鲤鱼卵黄中含有一类分子量为 110 kDa 的蛋白质，其含量最丰富，从实验结果看，

* 文中缩写：E-64, N-N-(1, 3-trans-carboxyoxiran-2-carbonyl)-L-leucyl-agmatine; iPr_2P-F, diisopropyl fluorophosphate; $PhMeSO_2F$, phenylmethylsulfonyl fluoride; $TospheCH_2Cl$, tosylphenylalanine chloromethane。

该类成分是蛋白酶的主要作用底物。而昆虫的卵黄蛋白组分较复杂。

鲤鱼卵黄蛋白水解酶的作用 pH 在酸性范围，在胚胎发育早期，一方面内部环境可能会由于质子-ATP 酶作用而酸化，同时外界环境的 pH 条件也可能会对酶的活性产生影响，这尚待进一步研究。

参 考 文 献

赵小凡，Takahashi S Y，1993. 家蚕卵半胱氨酸蛋白酶纯化及抗血清制备. 动物学研究，**14**(1)：93—95.

赵小凡，王金星等，1994. 蓖麻蚕卵黄磷蛋白降解酶纯化及性质. 动物学报(纪念陈桢教授诞辰100周年论文集)，146—155.

Bond J S，Butler P E，1987. Intracellular proteases. *Ann. Rev. Biochem.*，**56**：333-365.

Fagotto F，1991. Yolk degradation in tick eggs：Ⅲ. Developmentally regulated acidification of the yolk spheres. *Develop. Growth and Differ.*，**33**(1)：57-66.

Ikeda M，Sasaki T *et al*，1990. Purification and characterization of protease responsible for vitellin degradation of the silkworm. *Bombyx mori. Insect Biochem.*，**20**：725-734.

Kageyama T，Takahashi S Y，1990. Purification and characterization of a cysteine proteinase from silkworm eggs. *Eur. J. Biochem.*，**193**：203-210.

Laemmli U K，1970. Cleavage of structural proteins during the assemble of the head of bacteriophage T_4. *Nature*，(*London*)，**227**：680-685.

Lowry O H，Rosebrough A L *et al*，1951. Protein measurement with the Folin-Phenol regent. *J. Bio. Chem.*，**193**：265-175.

THE STUDIES ON THE PROTEINASES RESPONSIBLE FOR THE DEGRADATION OF THE YOLK PROTEINS IN *Cyprinus carpio*

Zhao Xiaofan Wang Jinxing Li Ming

(*Department of Biology*，*Shandong University* *Jinan* 250100)

Abstract

The proteinases responsible for the degradation of yolk proteins in the eggs of *Cyprinus carpio* were studied. It was proofed that there were endogenous proteinases in the oocytes. The optimum pH of the proteinases to the yolk proteins was about 3. The activities of the proteinases could be inhibited by E-64 and pepstatin, which suggested the proteinases belonged to the cysteine proteinase family and aspartic proteinase family. The proteinases could hydrolyze the bovine hemoglobin at pH4. There was one major kind of protein in the yolk proteins, which was estimated as 110 kDa by SDS-PAGE. This protein was the major endosubstrate of the proteinases.

Key words *Cyprinus carpio*，Proteinases，Characterization